

07/764,073



(11) Numéro de publication: **0 162 782 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt: 85400999.0

(51) Int. Cl.⁴ **C 12 N 15/00**
C 12 N 5/00, C 12 N 9/50

(22) Date de dépôt: 21.05.85

(30) Priorité: 22.05.84 FR 8407959
05.10.84 FR 8415294

(41) Date de publication de la demande:
27.11.85 Bulletin 85/48

(54) Etats contractants désignés
AT BE CH DE FR GD IT LI LU NL SF

(71) Demandeur: **TRANSGENE S.A.**
96 rue Saint-Lazare
F-75009 Paris(FR)

(72) Inventeur: de la Salle, Henri
10, rue du Général Leclerc
F-67400 Ostwald(FR)

(72) Inventeur: Drilhen, Robert
10, rue Paul Deroulade
F-67000 Strasbourg(FR)

(72) Inventeur: Altenburger, Werner
Esterli Weg 135
CH-1426 Riehen Canton de B.S. (BAle)(CH)

(72) Inventeur: Toftoshev, Paul
28 Barcoo Street
East Roseville Sydney(AU)

(72) Inventeur: Lecocq, Jean-Pierre
8, rue du Champ du Feu
F-67460 Reichstett(FR)

(74) Mandataire: Warcolin, Jacques et al.
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber
F-75116 Paris(FR)

(52) Vecteurs d'expression du facteur IX et lignées cellulaires produisant le facteur IX actif.

(57) L'invention concerne un vecteur d'expression dans les cellules de vertébré du facteur IX ou d'une protéine analogue, caractérisé en ce qu'il est constitué du génome d'un virus de la famille des Poxvirus dans lequel a été inséré un gène codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue de facteur IX.

EP 0 162 782 A1

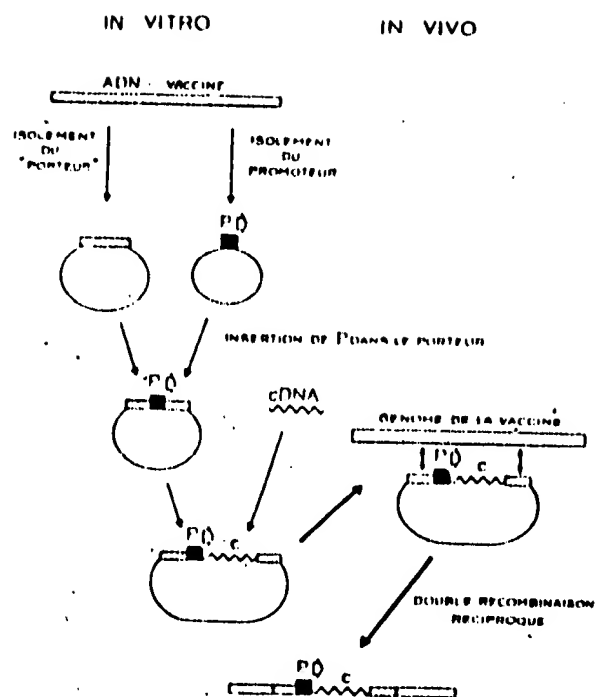


FIG. 6

0162782

VECTEURS D'EXPRESSION DU FACTEUR IX ET LIGNÉES
CELLULAIRES PRODUISANT LE FACTEUR IX ACTIF

La présente invention concerne la construction de lignées cellulaires produisant du facteur IX humain ou des molécules analogues.

Le facteur IX est une protéine intervenant au cours de la coagulation du sang. Il est synthétisé sous forme d'un zymogène et modifié post-traductionnellement par l'addition de chaîne hydrocarbonée, l'hydroxylation d'un acide aspartique et la conversion des 12 acides glutamiques en acides γ -carboxyglutamiques. Cette dernière modification dépend de la vitamine K (Bertina et coll., 1981).

Le foie est le site de synthèse du facteur IX.

Le facteur IX possède une activité réduite ou est absent dans le sang des hémophiles B. L'hémophilie B se manifeste par un temps de saignement très prolongé, comme la forme la plus fréquente de l'hémophilie, l'hémophilie A, et elle est transmise sous forme d'un caractère récessif lié au sexe (Hedner et coll., 1982).



Le facteur IX, lorsqu'il est fourni à des hémophiles B, restaure des temps de saignements normaux.

Pour l'instant, la seule source disponible de facteur IX est le plasma humain, bien que dans certains cas la protéine bovine correspondante puisse être utilisée.

Les préparations de facteur IX peuvent être pyrogènes (provoquer des fièvres) et comportent aussi des risques de contamination des agents pathogènes ou des virus tels que le virus de l'hépatite et les agents vecteurs du S.I.D.A.

C'est pourquoi il est intéressant de développer un procédé permettant la préparation du facteur IX de très haute pureté par la technique des ADN recombinants.

Toutefois, cette technique se heurte à certaines difficultés.

Le facteur IX est une protéine hautement modifiée, ainsi que cela a été mentionné au deuxième paragraphe.

L'importance de ces modifications pour la stabilité ou l'activité du facteur IX est mal connue. On pense que les acides glutamiques modifiés sont essentiels pour l'activation du facteur IX.

C'est pourquoi la Demanderesse a mis au point un vecteur permettant d'exprimer le facteur IX sous une forme active, c'est-à-dire tenant compte des structures particulières évoquées précédemment.

Il s'agit d'un vecteur d'expression constitué par un virus de la famille des Poxvirus, en particulier du genre Orthopoxvirus, par exemple le virus de la vaccine, comportant un gène codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue du facteur IX, ce gène étant sous la dépendance d'un promoteur d'un gène de Poxvirus, par exemple le promoteur du gène codant pour la protéine 7,5K de la vaccine.

Dans ce qui suit, on parlera essentiellement de virus de la vaccine qui est l'espèce type de la famille et, en particulier, du genre, mais d'autres orthopoxvirus peuvent être utilisés, en particulier le virus Cowpox.

5 Lorsque l'on indique que le vecteur d'expression est constitué par un virus de la vaccine, il est bien entendu que ce virus peut être incomplet, c'est-à-dire que lors de l'élaboration du vecteur certaines parties peuvent avoir été déléetées, dans la mesure où ces
10 déléetions ne modifient pas les propriétés essentielles du virus.

De façon générale, on entendra désigner dans la présente description par "protéine analogue au facteur IX" une protéine ayant le même type d'activité biologique in vivo
15 ou une activité apparentée, en particulier il peut s'agir d'une protéine ayant la même structure que le facteur IX à certains amino-acides près, des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la β -hydroxylation et la γ -carboxylation ne sont pas nécessairement identi-
20 ques à celles de la molécule naturelle, l'important étant d'avoir une molécule présentant une activité coagulante pouvant suppléer celle du facteur IX naturel ; ou bien des fragments du facteur IX ayant l'activité essentielle de la molécule complète.

25 L'expression d'une séquence codante pour une protéine exogène telle que le facteur IX par le virus de la vaccine (VV) implique nécessairement deux étapes :

1°) La séquence codante doit être alignée avec un promoteur de VV et être insérée dans une région non
30 essentielle de l'ADN de VV, clonée dans un plasmide bactérien approprié.

2°) Les séquences d'ADN de VV situées de part et d'autre doivent permettre des recombinaisons homologues in vivo entre le plasmide et le génome viral. Une double recombinaison réciproque conduit à un transfert de l'insert

d'ADN du plasmide dans le génome viral dans lequel il est propagé et exprimé (Panicali et Paoletti, 1982 ; Mackett et coll., 1982 ; Smith et coll., 1983 ; Panicali et coll., 1983).

5 C'est pourquoi l'ensemble promoteur/séquence codant pour le facteur IX défini précédemment sera inséré dans un gène du virus de la vaccine, par exemple le gène de thymidine kinase (TK), ce qui permet la recombinaison homologue et fournit une possibilité de sélection
10 comme cela sera expliqué ci-après.

Le virus hybride ainsi obtenu peut être utilisé pour infecter une culture cellulaire de laquelle on pourra extraire le facteur IX ou la protéine analogue par des techniques connues à partir des broyats cellulaires
15 ou des milieux de culture.

Les cellules hôtes de vertébré, en particulier de mammifère, peuvent être variées mais adaptées au vecteur mis en oeuvre.

En particulier, ces cellules peuvent être des
20 cellules de foie humain qui proviennent donc de l'organe produisant in vivo le facteur IX.

Parmi ces cellules, il faut citer la lignée HepG2. Les procédés permettant de préparer ce type de lignées cellulaires sont décrits notamment dans le brevet WO 81 03663
25 au nom de The Wistar Institute of Anatomy and Biology.

Ces cellules, bien qu'elles ne fabriquent pas de facteur IX, produisent des protéines de la chaîne de la coagulation sanguine, dont certaines possèdent des propriétés chimiques identiques au facteur IX (facteur X, protéine C, prothrombine). Ces cellules sont donc des hôtes de choix
30 pour la mise en oeuvre de la présente invention.



En outre, les expériences effectuées confirment que dans ce procédé d'autres cultures de cellules pou-
vaient être utilisées, en particulier des cellules de
rein telles que les cellules Vero ou les cellules
BHK21.

Le virus de la vaccine ne peut accomplir de cycle infectueux sur la lignée CHO. Il n'est donc pas possible d'utiliser le vecteur de la vaccine pour produire une quantité suffisante de facteur IX avec les cellules CHO.

On utilise un vecteur dérivé du virus Cowpox, virus appartenant à la famille du virus de la vaccine, mais capable d'infecter les cellules CHO.

Les cellules transformées ou transfectées sont cultivées sur un milieu approprié assurant leur croissance. Après culture, les cellules ou les milieux de culture sont récoltés et la protéine du facteur IX peut être isolée par des techniques connues de purification des protéines et antigènes.

La présente invention concerne également des procédés de transformation de cellules de mammifère, de culture de ces cellules produisant du facteur IX ou des protéines analogues, ainsi que les protéines analogues au facteur IX obtenues au moins en partie par culture de cellules de mammifère.

De façon plus générale, la présente invention concerne également un procédé de préparation de protéine fabriquée par le foie, caractérisé en ce que l'on cultive une lignée de cellules hépatiques infectée par un virus de la vaccine dans le génome duquel a été inséré le gène codant pour ladite protéine sous la promotion d'un promoteur de la vaccine.

La présente invention a permis, en outre, de mettre en évidence l'importance de la vitamine K dans le milieu de culture cellulaire sur l'activité du facteur IX obtenu.

5 C'est pourquoi la présente invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation du facteur IX actif, caractérisé en ce qu'on cultive une lignée cellulaire de mammifère infectée avec un virus recombinant dénommé vecteur d'expression, comme décrit précédemment, la lignée
10 cellulaire infectée étant cultivée sur un milieu comportant de la vitamine K.

La quantité de vitamine K mise en oeuvre peut varier en fonction des cultures cellulaires mais sera, de préférence, en quantité assurant la saturation du milieu,
15 par exemple entre 20 et 80 $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture et, en général, sera de l'ordre de 50 $\mu\text{g/ml}$. Un excès de vitamine K ne semble pas nuisible et cette vitamine est consommée durant la croissance.

Les milieux de culture en eux-mêmes sont connus.
20 Ainsi lorsque les cellules utilisées sont des cellules dérivant de reins telles que les cellules Vero, le milieu utilisé peut être le milieu Dulbecco; pour les cellules BHK21 le milieu est MEM-Galsgow; pour les cultures dérivant de foies telles que Chang on utilisera un milieu
25 MEM. Ces milieux sont, de préférence, additionnés de 10 % de sérum de veau foetal.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux compris à la lecture de des exemples ci-après.

30 La préparation du virus vecteur selon l'invention comporte notamment les étapes suivantes :

1/ L'obtention d'un clone de cADN correspondant au facteur IX schématisée sur les figures 1 à 3 :

. la figure 1 représente le schéma de la sonde de facteur IX avec ses homologues avec le cADN

0162782

du facteur IX,

. la figure 2 représente la séquence d'une partie du cADN obtenu;

. la figure 3 représente la stratégie de préparation de M13tg315.

2/ La synthèse d'un mini-plasmide pTG1H A partir de pBR322 (figure 4).

3/ L'insertion dans ce mini-plasmide du fragment Hin-J portant le gène TK de VV.

4/ L'insertion dans le gène TK du promoteur de la protéine 7,5K (figure 5).

5/ L'insertion sous la promotion de P7,5K du gène codant pour le facteur IX porté par M13tg315 (figure 5).

6/ Le clonage des éléments essentiels de ce dernier plasmide dans le virus de la vaccine (figure 6).

Les exemples suivants illustrent les propriétés des différents composants obtenus. Les différents matériels mis en oeuvre sont identifiés dans les exemples.

Sauf indication contraire, les enzymes sont utilisées dans les conditions préconisées par le fabricant et les techniques mises en oeuvre sont connues de l'homme de métier.

Les séquences d'acides aminés et les séquences de nucléotides représentées sur les figures ne sont pas reprises dans le corps de la description pour ne pas l'alourdir mais elles en constituent une partie intégrante.

Obtention d'un clone de cADN correspondant au facteur IX humain

L'obtention de ce clone de cADN correspondant au facteur IX humain a déjà été décrite dans le brevet français n° 84 07125 au nom de la Demanderesse.

Pour obtenir un clone de cADN correspondant au facteur IX humain, on utilise une sonde constituée d'un oligonucléotide synthétique unique.

De façon surprenante, il a été possible d'obtenir

directement le clone du facteur IX à partir d'une banque de cADN de foie humain en utilisant cet oligonucléotide synthétique, bien que seule la séquence d'acide aminé du facteur IX bovin soit connue.

5 Matériels et méthodes (Jaye M. et coll.)

1. Isolation d'ARN messagers polyadénylés
et synthèse du cADN

10 L'ARN est préparé à partir de 5 g de foie humain en utilisant la technique d'extraction au chlorhydrate de guanidium 8 M, tel qu'il est décrit par Tolstoshev et coll., 1981.

15 L'ARN ainsi obtenu est chromatographié sur une colonne de polyU-Sepharose (Pharmacia) comme cela est indiqué par le fabricant de façon à obtenir un extrait en ARN contenant du poly-A.

20 Les séquences de poly-A servent de guide pour la transcription réverse en utilisant des oligo (dT) comme "amorce". Le cADN a été synthétisé en utilisant 100 µl de réactif contenant 100 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 30 mM de mercaptoéthanol, 10 µg/ml d'oligo (dT), 50 µg/ml de poly-A-ARN, 0,5 mM de chaque de dATP, dGTP, dTTP et dCTP, 80 unités de transcriptase réverse de virus de myoblaste avien (Life Sciences Inc.,).

25 Après 45 minutes à 42°C, la réaction est terminée et le complexe de cADN-ARN dénaturé par chauffage à 105°C pendant 3 minutes puis est transféré rapidement sur bain de glace.

30 Pour la synthèse du second brin d'ADN, le mélange réactionnel précédent est dilué 5 fois et ajusté jusqu'à une concentration finale avec 100 mM HEPES-KOH, pH 6,9, 100 mM de KCl, 200 µM de dATP, dGTP, dTTP et P32-dCTP (activité spécifique 0,5 Ci/mmmole).

35 10 unités de polymérase ADN de E. coli (fragment Klenow) (Boehringer Mannheim) sont ensuite

ajoutées et l'incubation est effectuée à 25°C pendant 2 heures.

le cADN double brin (dscADN) est extrait avec un volume égal de phénol : chloroforme (50 : 50), saturé avec 10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1 mM d'EDTA, et précipité 2 fois à l'éthanol.

Approximativement 970 ng de dscADN sont obtenus à partir de 5 µg de poly-A-ARN. Les extrémités sont rendues franches par digestion avec 5 unités de nucléase S1 dans un milieu réactionnel de 0,1 ml contenant 30 mM d'acétate de sodium, pH 4,8, 300 mM de NaCl, 3 mM de ZnCl₂. Après 1 heure à 37°C, l'EDTA et SDS sont ajoutés jusqu'à une concentration finale de 10 mM et 0,1 % respectivement et le mélange réactionnel est chauffé à 65°C pendant 5 minutes.

Le dscADN digéré par S1 est alors appliqué sur un gradient de sucrose pré-établi 5-20 % contenant 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM d'EDTA, 100 mM de NaCl, et centrifugé à 30 000 tours par minute à 15°C pendant 16 heures sur un rotor SW60 Ti.

Les fractions de 0,5 ml sont collectées. Pour déterminer la taille du cADN, 1 µl de chaque fraction est analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose neutre et la migration de chaque fraction est comparée avec un marqueur de poids moléculaire approprié.

Les fractions contenant des cADN plus grands que 1 kilobase sont rassemblées puis précipitées avec 2 volumes d'éthanol pendant une nuit en présence de 5 µg de tARN de *E. coli* comme entraîneur. Le précipité est remis en suspension dans 20 µl 0,1 x SSC (5 mM de NaCl, 0,5 mM de citrate de sodium, pH 7,0).

II. Clonage du cADN

Des éléments d'extrémités homopolymères (approximativement 15 dCMP) sont ajoutés à l'extrémité 3' du cADN en utilisant la deoxynucléotidyl terminale transférase (Deng et coll., 1981).

De manière similaire, des éléments d'extrémités homopolymères poly-dGMP (approximativement 10 dGMP) sont ajoutés aux extrémités 3' du plasmide pBR322 préalablement digéré avec l'enzyme de restriction PstI.

5 60 ng de cADN possédant des extrémités de poly-C-dCMP et 1 µg du vecteur préparé dans les conditions du paragraphe précédent sont chauffés pendant 2 heures à 42°C dans 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM de NaCl. Les plasmides recombinants sont utilisés pour transformer la souche E. coli 8739 (Murray et coll., 1977) et les transformants sont sélectionnés sur plaque d'agar-LB contenant 15 µg/ml de tétracycline. On obtient 30 000 transformants dont environ 50 % comportent un insert de cADN supérieur à 1 kb. Tous les transformants sont prélevés des plaques dans un volume minimum de LB et après addition d'un volume égal de glycérol, la banque obtenue est stockée à - 20°C.

III. Sélection et synthèse de la sonde oligonucléotide pour le facteur IX

20 1755 nucléotides de séquences de gènes codant pour des protéines bovines synthétisées par le foie sont analysés (Mac Gillivray et coll., 1980 et Chung et coll., 1981) de façon à mettre en évidence les codons utilisés préférentiellement. On a sélectionné une séquence de 52 bases. Cet oligonucléotide est construit de la façon suivante :

30 L'oligonucléotide A : d(CTCACACTGATCACCATCCACATACT), l'oligonucléotide B : d(GCTTCCAGAACTCTGTAGTCTTCTCA) et le fragment complémentaire C : d(GGAAGCAGTATGT) sont synthétisés chimiquement par la méthode phosphotriester sur un support solide inorganique comme cela a été décrit précédemment par Kohli et coll., 1982 et purifiés par HPLC comme décrit par Fritz, 1978.

35 0,5 nmole d'oligonucléotide B est mis en incubation pendant 30 minutes à 37°C dans un milieu réac-

tionnel de 10 μ l contenant 60 mM de Tris-HCl, pH 7,8, 6 mM de $MgCl_2$, 6 mM de dithiothréitol, 0,1 mM d'ATP, 6 pmoles P^{32} -ATP (3000 Ci/mme), 2 unités de kinase T4 polynucléotide. L'oligomère B 5'phosphorylé est mélangé avec 0,5 nmole d'oligonucléotide A et C dans 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM d'EDTA, chauffé à 100°C et le mélange est refroidi lentement jusqu'à 4°C. Le mélange réactionnel des oligonucléotides A et B est ligué dans 50 μ l de mélange réactionnel contenant 66 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM de NaCl, 7,5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de dithiothréitol, 0,5 mM de spermidine, 0,2 mM d'EDTA, 4 unités de ligase DNA T4 à 4°C pendant une nuit.

Le 52mer résultant est alors purifié du mélange de ligation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 20 %.

IV. Analyse de la banque de cADN de foie humain

10 000 colonies environ sont mises en croissance pendant une nuit sur plusieurs boîtes d'agar LB contenant 10 μ g/ml de tétracycline. Le jour suivant les colonies bactériennes sont transférées sur filtres de nitrocellulose et les filtres sont préparés pour l'hybridation sur des colonies, essentiellement comme cela a été décrit par Grunstein et coll., 1979. Les bactéries restantes, sur les boîtes à la tétracycline d'origine, sont remises en croissance pendant quelques heures à 37°C.

La sonde d'hybridation est préparée par kination de 100 ng du 52mer avec 50 μ Ci de P^{32} -ATP. L'hybridation est effectuée à 48°C pendant une nuit dans 40 ml de 6 x SSC et 1 x de solution de Denhardt, 0,1 % de SDS, 50 μ g/ml d'E. coli tARN.

Le jour suivant, les filtres sont lavés à 42°C plusieurs fois avec une solution de 6 x SSC, 0,1 % de SDS. Les filtres sont séchés puis autoradiographiés pendant une nuit.



Résultats

La séquence d'acides aminés du facteur IX bovin (Katayama et coll., 1979) est analysée pour trouver une séquence longue composée d'acides aminés déterminés par des codons faiblement dégénérés.

La sonde a ainsi été réalisée pour correspondre aux acides aminés 36 à 52 du facteur IX bovin, qui correspond à 4 acides aminés codés par 4 codons (thr, val, gly), 12 acides aminés codés par 2 codons (glu, lys, phe, gln, tyr, asp, cys) et 1 acide aminé codé par 1 codon (trp) (figure 1).

Ensuite, l'analyse de 585 codons de la prothrombine bovine et du fibrinogène bovin ont révélé que le codon valine GTG est utilisé 21 fois sur 38. De même TTC et TGT sont utilisés 2 fois plus fréquemment que les autres codons des acides aminés phe et cys, respectivement.

Aucune autre préférence très nette ne se détache à l'analyse, toutefois, certains nucléotides sont trouvés peu fréquemment en 3ème position pour certains codons, par exemple G dans le cas de la glycine et de la thréonine.

En outre, l'appariement G:T, bien que moins stable que la paire de bases G:C, contribuera au moins à la stabilisation de l'hybridation du 52mer durant l'hybridation de la colonie, tandis que l'appariement A:C ne le fera pas.

Ainsi, G a été choisi pour chacun des acides aminés (glu, lys, gln) dans lesquels le choix en 3ème position du codon dégénéré était soit G soit A ; de même T a été choisi par rapport à A dans le cas des acides aminés tyr et asp.

Compte tenu de ces considérations, le choix s'est limité à T ou G comme nucléotide en 3ème position pour la thréonine et la glycine ; toutefois, comme cela a été indiqué précédemment, G se trouve peu fréquemment en 3ème position des codons de la thréonine. Ainsi on a choisi T pour l'un des codons de la thréonine et de façon à écarter un problème possible d'une structure secondaire à l'intérieur du 52mer, choisi T en position 3 pour la glycine et A en position 3 pour le second codon de la thréonine.

Sélection de la banque de cADN humain et
identification du cloné de facteur IX

La stratégie d'origine était d'utiliser le 52mer pour sélectionner la banque de cADN de foie de bovin et ensuite utiliser ce clone de cADN de facteur IX bovin sous forme d'une sonde pour une banque de cADN de foie humain. Cette stratégie reposait sur une hypothèse de généralisation de l'homologie connue dans les séquences d'acides aminés à l'extrémité N des protéines bovines et humaines (voir Di Scipio et coll., 1977).

En s'appuyant sur cette homologie inter-spécifique dans les séquences d'acides aminés, on a effectué une sélection parallèle d'une banque de foie de bovin et de foie humain.

Les conditions d'hybridation et de lavage employées furent peu sévères car l'homologie actuelle entre la sonde 52mer et le cADN de facteur IX était inconnue.

Différentes colonies dans la banque de cADN bovin donnèrent des signaux positifs par sélection avec la sonde 52mer. Dans la banque de cADN de foie humain, une colonie a été obtenue, qui donne un signal dans les

0162782

conditions mises en oeuvre. Compte tenu du fait que la présente recherche a été effectuée dans le but d'isoler un cADN de facteur IX humain, il n'a pas été effectué d'autres analyses sur les clones bovins et tous les efforts se sont portés sur le clone humain.

Pour établir que cette colonie correspond au facteur IX humain, le plasmide recombinant est digéré avec PstI, puis l'insert de cADN excisé est transféré dans le phage M13mp8 (Messing et coll., 1982) et séquencé en utilisant des didéoxynucléotides comme terminateurs de chaîne (Sanger et coll., 1977). La séquence obtenue correspond aux nucléotides 1-180 de la figure 2, la séquence d'acides aminés déduite confirme que le clone est un clone de cADN de facteur IX humain.

La séquence plus complète de l'insert de cADN de ce clone, pTG397, est déterminée en combinant les méthodes de Maxam et de Gilbert, 1980, ou de Sanger, à partir de segments de restriction sous clonés dans M12mp9. La séquence obtenue est indiquée dans la figure 2.

Discussion du résultat

En employant une sonde oligonucléotide unique, il a été possible d'isoler un clone de facteur IX humain contenant un insert de 2,1 kb. Lorsque l'insert de 2,1 kb est utilisé comme sonde pour trier une seconde banque de cADN de foie humain, un autre clone spécifique de facteur IX, pTG398, contenant un insert de 2,6 kb est isolé.

L'extrémité 5' de pTG398 est située au nucléotide 480 de la figure 2. Ceci suggère que l'extrémité non traduite 3' de pTG397 est incomplète et que l'extrémité complète 3' non traduite a une longueur d'environ 1,7 kb.

On observe une différence entre la séquence de nucléotide obtenue et la séquence donnée par Kurachi et Davie.

Cette différence comporte une transition au nucléotide 581 (G- >A), transformant l'alanine en thréonine. La détermination de la séquence d'acides aminés du peptide de connexion du facteur IX confirme la présence de thréonine dans cette position. Ces données suggèrent que comme pour d'autres protéines sériques le facteur IX est polymorphe (Cooper, 1978).

Cette hypothèse a été confirmée (MacGran R.A. et al., Blood 64, 264a, 1984)

En considérant l'utilisation des codons de substitution G:T et l'élimination de la structure secondaire possible dans la sonde de nucléotide, on a pu obtenir un 52mer unique qui s'est révélé être utile de façon satisfaisante comme sonde pour le séquençage d'un clone unique. Le 52mer choisi est homologue avec la séquence clonée pour 43/52 nucléotides tandis que deux appariements erronés sont des paires G:T.

Ceci reflète une homologie à 85 % dans les séquences de nucléotides interspécifiques observées précédemment.

Structure générale du cADN de facteur IX

La connaissance des séquences de nucléotide du cADN de facteur IX permet de déduire la séquence d'acides aminés codée de la protéine correspondante. L'insert de cADN de pTG397 révèle les caractéristiques suivantes du facteur IX humain :

- a. Le facteur IX est une protéine contenant 415 acides aminés. Dans la figure 3, les nucléotides 140-1384 codent pour le facteur IX humain.



5 b. Le facteur IX humain est synthétisé sous
 forme d'un précurseur avec une séquence
 signal attachée et une séquence de pré-
 protéine. Ceci est une caractéristique
 commune à toutes les protéines qui sont
 destinées à être sécrétées. Dans le cas du
 facteur IX, il y a une séquence signal
 classique d'environ 25 acides aminés codés
 par les nucléotides 2-76, inclus. L'extension
10 hydrophobe des acides aminés est normalement
 éliminée pendant la sécrétion de la protéine
 à l'extérieur de la cellule. Les nucléotides
 77-139 inclus codent pour une séquence de
 préprotéine qui probablement rapidement après
15 la sécrétion est éliminée de la forme mature
 du facteur IX (commençant avec la tyrosine
 au nucléotide 140).

 Comme cela est souvent trouvé à la fin de la
 séquence de préprotéine, la structure d'acides
20 aminés dibasiques lys-arg est trouvée à la
 jonction entre la séquence de préprotéine et le
 premier acide aminé du facteur IX mature.

 c. La forme activée du facteur IX (IXa) est pro-
 duite à partir de la forme inactive ou zymogène
25 du facteur IX par hydrolyse de deux liaisons
 peptides par le facteur XI activé (XIa). Ces
 liaisons peptides sont trouvées entre les acides
 aminés arg-ala (nucléotides 572-577) et val-val
 (nucléotides 677-682). Le peptide le plus long
30 de 35 acides aminés libéré pendant l'activation
 du facteur IX est appelé le peptide d'activation.



Le facteur IXa est ainsi composé de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne légère de 145 acides aminés (nucléotides 140-574) et une chaîne lourde de 235 acides aminés (nucléotides 680-1384). Les chaînes légères et lourdes du facteur IXa sont maintenues ensemble par des ponts disulfures. La chaîne lourde comprend un site actif typique de la sérine-protéase (met-phe-cys-ala-gly, nucléotides 1181-1195) de même que d'autres résidus importants dans l'activité catalytique de la sérine-protéase typique. La chaîne légère contient 12 unités d'acide glutamique qui sont γ -carboxylées pour produire l'acide γ -carboxy-glutamique par un processus qui dépend de la vitamine K.

Ceci est important dans la fixation du facteur IXa au Ca^{++} , à la membrane phospholipidique membranaire et au facteur VIIIa dans le cycle de coagulation.

- d. Au contraire du facteur IX bovin qui a 4 sites pour la fixation d'hydrate de carbone, le facteur IX humain a 2 sites potentiels pour l'attachement des hydrates de carbone. Ces sites sont tous situés dans le peptide d'activation, aux nucléotides 608-616 et 638-646, et contiennent la séquence typique asn-x-thr/ser. Par contraste, le facteur IX bovin a 4 hydrates de carbone attachés dont la structure a été récemment déterminée par Mizurochi et coll., 1983.

Préparation du cADN de facteur IX cloné
nécessaire pour l'expression (voir figure 3)

5 pTG397 a été mis en digestion avec l'enzyme de restriction PstI. Comme la banque de cADN a été clonée par des extrémités G/C dans le site PstI de pBR322 et, en outre, que le facteur IX de pTG397 ne contient pas un site interne de reconnaissance PstI, ce traitement libère un cADN intact de 2,1 kb correspondant au facteur IX, avec des extrémités susceptibles d'être clonées dans les sites PstI.

10 Le fragment de cADN facteur IX est transféré par des procédures standards dans le phage M13mp8 qui a été précédemment mis en digestion avec PstI et traité avec la phosphatase alcaline. Les phages recombinants sont utilisés pour transfecter une souche de E. coli JM103.

15 Le phage recombinant M13tg397B est utilisé comme source de cADN de facteur IX comme cela sera décrit ci-après.

20 Le cADN de facteur IX contient un site de reconnaissance unique pour l'enzyme FnuDII qui reconnaît la séquence de tétranucléotide CGCG située sur les nucléotides 7-10.

25 Par digestion de M13tg397B avec PstI et FnuDII, on obtient un grand fragment et de nombreux petits fragments, correspondant à 19 sites de reconnaissance pour FnuDII dans M13mp8. Le fragment le plus grand correspondant au fragment FnuDII:PstI.

30 Ce fragment écarte 9 nucléotides et les extrémités G/C de l'extrémité 5' du cADN de facteur IX. Il a été considéré comme important d'écarter les extrémités G/C de l'extrémité 5' de façon à augmenter l'expression et la stabilité du cADN de facteur IX dans le vecteur d'expression.

En éliminant ces 9 nucléotides, on élimine un ATG de la séquence signal. Il n'est pas sûr toutefois que cet ATG soit l'ATG qui initie la traduction. La portion du facteur IX éliminée par digestion avec FnuDII est dans la séquence signal et en conséquence n'est pas importante pour l'activité du facteur IX.

La séquence signal, si la traduction débute normalement à l'ATG éliminé lors de la digestion par FnuDII, est écourtée de 5 acides aminés. De façon à déterminer si ces 5 acides aminés additionnels sont importants pour la sécrétion et/ou pour l'utilisation du facteur IX, la séquence de nucléotide éliminée par digestion avec FnuDII est restaurée en utilisant deux oligonucléotides synthétiques :

15 A) 5' GATCCATGCAGCG 3'

 B) 5' CGCTGCATG 3'

La séquence soulignée dans l'oligonucléotide A correspond à la séquence écartée, moins le premier nucléotide T, du phage M13tg397B par digestion avec FnuDII.

20 L'oligonucléotide B est complémentaire de l'oligonucléotide A.

L'hybridation des oligonucléotides A et B donne la structure à double brin suivante qui possède des extrémités BamHI cohésives :

25 5' GATCCATGCAGCG 3'
 3' GTACGTCGC 5'

5

10

15

20

25

Le fragment HindIII (Hin-J) du génome de VV contient le gène complet de la thymidine kinase (TK) qui a déjà été utilisé précédemment pour permettre l'échange et la recombinaison de l'ADN à insérer dans le génome de VV (Mackett et al., 1982). Il est important de noter que le transfert d'un insert dans le gène TK dans le génome de VV crée un virus TK déficient qui peut être reconnu en utilisant une simple sélection.

Il a tout d'abord été nécessaire de produire un plasmide de petite taille portant un site unique HindIII utilisable pour l'intégration du fragment Hin-J VV. En outre, il était important d'éliminer les séquences de restriction non nécessaire du plasmide de façon à permettre les manipulations suivantes.

3/ La construction a été amorcée à partir du plasmide pML2 (Lusky et Botchan, 1981) qui est un vecteur dérivé du plasmide pBR322 par délétion spontanée du segment entre le nucléotide 1089 et 2491 (figure 4).

D'abord la séquence de PstI a été éliminée par insertion du fragment AhaIII-AhaIII de pUC8 (Vieira et Messing, 1982) entre deux sites AhaIII de pML2 en éliminant 19 paires de bases. On a utilisé la méthode de "linker-tailing" (Lathe et al., 1984) pour insérer un linker HindIII entre les sites NruI et EcoRI traité par la nucléase S1 en éliminant le site BamHI. Ceci conduit à un plasmide de 2049 paires de bases portant le gène β -lactamase fonctionnel (conférant la résistance à l'ampicilline) et comportant en outre une origine de répllication active dans E. coli et un site de restriction unique HindIII.

Cette construction a été appelée pTGH.

4/ Le fragment Hin-J de l'ADN de VV portant le gène TK a préalablement été cloné dans un vecteur provenant de pBR327 (Drillien et Spehner, 1983). Ce fragment de 4,6 kb a été recloné dans le site HindIII de pTGIH. Un clone a été sélectionné dans lequel le gène TK est situé distalement par rapport au gène codant pour la résistance à l'ampicilline.

Cette construction pTGIH-TK a été utilisée comme porteur dans l'expérience suivante.

5/ L'étape suivante a été d'isoler un promoteur de VV utilisable pour commander l'expression de la séquence codant pour le facteur IX inséré. Le promoteur d'un gène précoce codant pour une protéine de 7 500 daltons (7,5K) a déjà été utilisé avec succès dans un but identique (Smith et al., 1983) et on a donc procédé à son isolement.

Le gène 7,5K est situé sur l'un des plus petits fragments SalI (fragment Sal-S) du génome de VV type WR (Venkatasen et al., 1981). Comme les petits fragments sont clonés de façon préférentielle, une grande proportion des clones obtenus par clonage direct de l'ADN de VV type WR coupé par SalI dans le plasmide pBR322 porte le fragment Sal-S. Ce fragment est transféré sur le bactériophage vecteur M13mp701 (voir Kieny et al., 1983), par digestion SalI et religation, en conduisant ainsi au phage M13tgSal-S.

Dans ce clone, un site ScaI se trouve immédiatement à proximité de l'ATG d'initiation du gène 7,5K. En aval du gène 7,5K se trouvent situés des sites uniques BamHI et EcoRI provenant du vecteur. Les sites BamHI et ScaI sont fusionnés par l'intermédiaire d'un linker BglII 5'-CAGATCTG-3' par la technique des "linker" après avoir complété les extrémités générées par digestion BamHI avec le fragment Klenow de la polymérase. Ce procédé

élimine le site ScaI mais reconstitue le site BamHI et place le site unique EcoRI immédiatement en aval du site BamHI. En même temps, le site Sall(AccI) en aval est éliminé, le site en amont devient donc unique.

Cette construction est appelée M13tg7,5K.

A l'intérieur du fragment Hind-J de l'ADN de VV se trouvent situés des sites Clal et EcoRI qui sont séparés par environ 30 paires de bases (Weir et Moss, 1983). Le fragment promoteur de 7,5K présent dans M13tg7,5K est excisé par AccI et EcoRI et cloné entre les sites Clal et EcoRI de pTG1H-TK pour générer pTG1H-TK-P7,5K dont la synthèse est schématisée figure 5.

Cette construction conduit au transfert du site BamHI unique du vecteur M13 immédiatement en aval de la séquence du promoteur 7,5K. Ce site unique BamHI est utilisé dans les constructions suivantes.

6/ pTG1H-TK-P7,5K est mis en digestion avec BamHI et ligué avec M13tg115 digéré par BamHI (figure 5).

Après transformation de E. coli l'un des plasmides recombinants isolé par cette procédure, pTG393, est sélectionné car il porte le cADN du facteur IX dans l'orientation correcte pour l'expression à partir du promoteur de 7,5K.

Clonage dans le virus de la vaccine (figure 6)

7/ La stratégie décrite par Smith et al. (1983) repose sur l'échange in vivo entre un plasmide portant un insert dans le gène VV TK et le génome viral de type sauvage de façon à inactiver le gène TK porté par le virus. Les virus TK⁻ peuvent être sélectionnés par étalement sur une lignée cellulaire TK-négative en présence de 5-bromo-déoxyuridine (5BUDR) (Mackett et al., 1982). La thymidine kinase phosphoryle le 5BUDR en 5'-monophosphate, qui est ensuite converti en triphosphate. Ce composé est un

analogue de dTTP et son incorporation dans l'ADN bloque le développement correct du virus. Un virus TK^- peut néanmoins répliquer son ADN normalement et il conduit à des plaques virales visibles dans une couche cellulaire également TK^- .

Le virus de la vaccine se propage dans le cytoplasme des cellules infectées plutôt que dans leur noyau. C'est pourquoi il n'est pas possible de tirer avantage de la machinerie de réplication et de transcription de l'ADN de l'hôte et il est nécessaire que le virion possède les composants pour l'expression du gène viral. L'ADN de VV purifié est non-infectieux.

Afin de générer les recombinants, il est nécessaire d'effectuer simultanément l'infection cellulaire avec un VV et une transfection avec le segment d'ADN cloné qui présente de l'intérêt. Toutefois, la génération des recombinants est limitée à une petite proportion des cellules compétentes pour la transfection à l'ADN. C'est pour cette raison qu'il a été nécessaire de mettre en oeuvre une stratégie de "congruence" indirecte pour réduire le bruit de fond des virus parentaux non-recombinants. Ceci a été effectué en utilisant comme virus infectieux vivant un mutant thermosensible (ts) de la vaccine qui n'est pas capable de se propager à une température non permisible de 39,5°C (Drillien et Spehner, 1983). Lorsque les cellules sont infectées avec un mutant ts dans des conditions non permissibles et transfectées avec l'ADN d'un virus de type sauvage, la multiplication virale interviendra seulement dans les cellules qui sont compétentes pour la transfection ; aucun résultat ne sera obtenu dans les autres cellules, en dépit du fait qu'elles ont été infectées.

Si un plasmide recombinant contenant un fragment de l'ADN de vaccine tel que pTG393 est inclus dans le mélange de transfection à la concentration appropriée avec l'ADN du type sauvage, il est également possible d'obtenir qu'il participe à la recombinaison homologe avec l'ADN de la vaccine dans les cellules compétentes.

Clonage des recombinants VV-FIX

Des fibroblastes d'embryons de poulets primaires (CEF) établis à partir d'embryons âgés de 11 jours sont mis en croissance jusqu'à confluence (2×10^6 cellules/boîte de 2 cm de diamètre) dans un milieu de base de Eagle (MBE/Eurobio) supplémenté avec du sérum de veau nouveau-né (SNV) (Drillien et Spohner, 1983).

Les cellules sont infectées à raison de 0,01 à 0,1 pfu par cellule avec un mutant du virus de la vaccine thermosensible N7 dérivé du virus de type sauvage Copenhague (Drillien et coll., 1981).

Après absorption du virus, les cellules sont incubées à une température permise pour le virus (33°C) pendant 2 heures dans MBE/SCN 5 %. Les cellules sont alors transfectées avec un mélange d'ADN virus de type sauvage (Wt) Copenhague purifié (30 ng par boîte) et l'ADN du plasmide chimérique contenant le gène étranger (30 ng/boîte) en utilisant la méthode de coprécipitation au calcium-phosphate.

Après 1 heure d'absorption, les cellules sont incubées pendant 2 heures à 39,5°C en présence de MBE/2 % SCN. Le précipité calcium est lavé 3 fois avec PBS et les cellules sont mises en croissance pendant 2 jours à une température non permise (39,5°C) avec 2 ml de MBE supplémenté avec 5 % SNV.

Ce procédé permet un enrichissement en virus de génome sauvage (Wt) ou recombinant.

Dans une seconde étape, les virus TK⁻ (recombinants) peuvent être sélectionnés comme indiqué précédemment en

présence de 5BUdR à 37°C. Dans ces conditions, les virus recombinants tk⁻ sont capables de se répliquer mais la croissance des virus Wt est empêchée par incorporation dans leur ADN d'analogue de dTTP.

5 Les virus sont clonés dans une première étape en utilisant un milieu solide contenant 1 % d'agar, des cellules LMTK⁻, 5 % de SNV (Drillien et coll., 1982) et reclés à nouveau sur des cellules TK⁻ en présence de 5BUdR. Pour
10 vérifier la recombinaison correcte du facteur IX dans le gène tk de VV, l'ADN total des cellules CEF infectées avec le virus recombinant est isolé et digéré avec diverses endonucléases. Après fractionnement, l'ADN est transféré sur
15 E. coli.

On sélectionne ainsi un virus VVRTG2 utilisé dans les expériences ci-après.

Le virus isolé est ensuite cultivé sur des tapis de cellules CEF pour obtenir une grande quantité de virus
20 en vue des expériences suivantes.

Infection des cellules de la lignée HepG2 par le virus de la vaccine

25 Les cellules HepG2 sont cultivées jusqu'à confluence dans des bouteilles à fond plat contenant un milieu composé de MEM (MEM, GIBCO) et de 5 % de sérum de veau foetal (SVF) (GIBCO) et supplémenté avec de la vitamine K (50 µg/ml). Ces boîtes contiennent environ 10⁷ cellules.

30 Elles sont infectées soit avec le virus de la vaccine recombinant, soit avec le virus sauvage. Pratiquement le milieu de culture des cellules est retiré et 500 µl d'un extrait contenant le virus de la vaccine sont déposés sur les cellules (soit environ 5 pfu/cellule). Les boîtes sont agitées à la température de la pièce pendant 1 heure, puis

10 ml de MEM additionné de SVF (5 %) et de vitamine K (50 µg/ml) sont ajoutés. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 97°C pendant différents temps (4 heures, 8 heures, 22 heures).

Analyse de milieux de culture des cellules infectées

5 On a étudié les surnageants de cellules hépatiques infectées par le virus de la vaccine sauvage et le virus recombinant. Cette analyse a été accomplie par l'étude des milieux 4 heures, 8 heures et 22 heures après l'infection. Les milieux ont été fractionnés par adsorption du facteur IX sur le citrate de barium selon un procédé classique (dérivé de Miletrich et coll.) : le facteur IX peut s'adsorber sur ce sel insoluble quand les acides carboxylés sont présents sur la molécule.

15 Pratiquement à un volume de surnageant de cellules infectées (7 ml de surnageant de cellules infectées par le virus de la vaccine recombinant ou normal) on ajoute du citrate de sodium (30 mM final) puis on introduit au goutte à goutte 1/10 de volume d'une solution de chlorure de barium 1 M tout en agitant continuellement.

20 On laisse agiter pendant une heure le mélange. Le précipité est centrifugé à 8 000 g pendant 20 minutes.

Le surnageant est récolté et subit un fractionnement de 30 à 70 % de sulfate d'ammonium. La fraction précipitée avec 70 % de NH_4SO_4 est reprise par addition de 200 µl de Tris 20 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, et est dialysé contre ce même tampon. Le volume final est alors de 800 µl environ. Le précipité de barium est resuspendu dans 0,3 volume de BaCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, puis recentrifugé à 8 000 g pendant 10 minutes. Cette opération de lavage du culot est répétée encore deux fois. Ensuite, le culot est repris dans 0,3 volume de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, puis on ajoute au goutte à goutte 0,075 volume de sulfate d'ammonium 2 M. Le mélange est agité pendant 1 heure puis centrifugé à 8 000 g 10'.

Les protéines du surnageant sont précipitées du sulfate d'ammonium (concentration 70 %) pendant 1 heure. Les protéines précipitées sont centrifugées 10' à 8 000 g.

Le culot est dissous dans 200 μ l de Tris 20 mM NaCl 150 mM, pH 7,5 et est dialysé contre le même tampon.

L'ensemble de ces opérations est accompli à 0°C.

Les fractions obtenues sont ensuite conservées à - 20°C.

Elles sont ensuite testées de deux façons :

a) La quantité d'antigène facteur IX est estimée avec un test ELISA (commercialisé par Diagnostica - Stago).

b) L'activité du facteur est calculée en mesurant le temps de coagulation d'un plasma d'hémophile supplémenté avec les extraits.

Ces mesures sont comparées avec celles obtenues en utilisant un mélange de plasmas humains normaux.

Les résultats s'expriment en pourcentage. Pratiquement 100 % correspond à la quantité de facteur présent dans 1 ml de sang humain normal.

Les résultats sont fournis sur le tableau joint. Dans ce tableau sont indiquées les concentrations en facteur IX par ml d'échantillon.

Dans les surnageants des cellules hépatiques infectées avec les virus de la vaccine sauvage, aussi bien dans la fraction adsorbée sur le citrate de barium que sur la fraction non adsorbée, la quantité d'antigène du facteur IX est inférieure à 1 %, l'activité coagulante reste inférieure à 2 %.

En revanche dans les surnageants des cellules infectées par le virus recombinant, la quantité de facteur IX dans la fraction adsorbable sur le citrate de barium augmente avec le temps d'infection. Les quantités estimées par les tests ELISA et d'activité sont semblables. Dans la fraction non

adsorbée sur le citrate de barium la quantité d'antigène reste faible (≤ 5 %) et l'activité reste comparable au bruit de fond détecté avec le virus sauvage.

5 En conclusion, les cellules HepG2 infectées avec le virus de la vaccine recombinant produisent du facteur IX actif. L'absence d'antigène facteur IX dans la fraction non adsorbée sur le citrate de barium montre que le facteur IX produit dans ces conditions est γ carboxylé pratiquement dans sa totalité.

10 Expression dans d'autres cellules

Les procédés expérimentaux sont similaires à ceux déjà décrits.

Ainsi, des tapis de cellules confluentes ont été infectés soit avec le virus sauvage soit avec le virus recombinant (1 à 5 pfu/cellule) dans les conditions
15 décrites dans le brevet principal. L'infection de cellules (c'est-à-dire la multiplication du virus dans les cellules) a été accomplie 22 heures dans les milieux de culture MEM (Chang), Dulbecco (Vero), MEM-Galagow (BHK21)
10 supplémentés avec 10 % de sérum de veau foetal. Ces milieux sont en outre additionnés de vitamine K (n° V3501, catalogue Sigma) à raison de 50 μ g/ml.

Après l'infection, les milieux de culture ont été fractionnés comme décrit dans le brevet principal.

25 Le tableau A décrit les résultats obtenus. Ils sont exprimés en unité et non en pourcent comme décrit pour les cellules HepG2. Une unité représente la quantité de facteur IX dans 1 ml de plasma humain normal.

Tableau A

Etude du facteur IX produit dans plusieurs
lignées infectées par VVRTG2

<u>Lignée</u>	<u>BHK21</u>		<u>Vero</u>		<u>Chang</u>	
5	WT : CII		WT : CII		WT : CII	
Virus						
Volume initial milieu de culture	53	55	40	40	30	30
10						
Volume fraction non adsorbée sur Barium (FI) (ml)	5	5	3,6	3,8	7	5
Volume fraction absorbée sur Barium (FII) (ml)	0,6	0,5	0,65	0,40	0,45	0,26
15						
Quantité antigène dans FI (U)	0,05	1,45	≤ 0,02	0,15	≤ 0,07	0,10
Quantité antigène dans FII (U)	0,02	3,65	≤ 0,02	1,09	≤ 0,02	0,58
Quantité activité dans FII (U)	0,01	4,55	≤ 0,02	1,07	0,16	0,73

20 Les résultats montrent que les trois lignées cellulaires infectées par le virus recombinant peuvent produire du facteur IX actif.

Cas des cellules HepG2

25 Les cellules HepG2 ont été cultivées pendant 12 à 15 générations (4 passages) dans du milieu MEM supplémenté avec 1% de substitut de sérum synthétique Ultrosor G, commercialisé par IBF (n° catalogue 50902), ce milieu était supplémenté ou pas avec la vitamine K. Les cellules ont ensuite été infectées avec les virus. Les résultats

30 obtenus sont rassemblés au tableau B.

Tableau B

Effet de la vitamine K sur la synthèse du facteur IX
dans les cellules HepG2 infectées par VVRTG2

	<u>Virus</u>	<u>VVRTG2</u>		<u>WT</u>		<u>VVRTG2</u>	
		<u>Ultrosor G</u>		<u>Ultrosor G</u>		<u>SVF</u>	
5	Sérum						
	Vitamine K	+	-	+	-	+	-
	Volume milieu culture (ml)	10	10	10	10	10	10
10	Quantité Ag fraction non adsorbée sur barium (U)	0,02	0,26	≤0,01	≤0,01	0,08	0,92
	Quantité Ag fraction adsorbée sur barium (U)	1,54	0,98	≤0,02	≤0,02	1,8	1,6
15	Activité fraction adsorbée sur barium (U)	1,32	0,36	0,04	0,04	-	-

Ce tableau B montre que les cellules cultivées et infectées en présence de vitamine K produisent du facteur IX actif γ carboxylé.

En revanche, les cellules cultivées et infectées sans supplément de vitamine K produisent un facteur IX moins γ carboxylé : la fraction non absorbée sur barium contient une quantité importante d'antigène facteur IX. De plus l'activité coagulante dans la fraction absorbée sur le barium est très inférieure au niveau attendu compte tenu de la quantité d'antigène.

Un effet similaire est noté lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu normal : si la vitamine K est omise au cours de l'infection la fraction non adsorbée sur le barium contient notablement plus d'antigène facteur IX.

0162782

Effet sur les cellules Vero

Les cellules Vero cultivées dans le milieu Dulbecco, additionné de sérum de veau foetal (10 %) ont été infectées avec le virus VVERTG2 ou sauvage. La multiplication des virus a été accomplie dans ce même milieu, éventuellement supplémenté en vitamine K. Les résultats obtenus sont rassemblés au tableau C.

Tableau C

Effet de la vitamine K sur la synthèse du facteur IX dans les cellules Vero infectées avec le virus VVERTG2

<u>Virus</u>	<u>VVERTG2</u>			<u>WT</u>	<u>VVERTG2</u>
Temps d'infection	12	22	38	22	22
Vitamine K (supplément)	-	-	-	+	+
Volume milieu de culture (ml)	20	20	10	40	40
Quantité Ag fraction non adsorbée sur barium (U)	0,86	1,06	0,73	0,04	0,30
Quantité Ag fraction adsorbée sur barium (U)	0,18	0,20	0,22	≤0,01	1,09
Activité fraction absorbée sur barium (U)	0,21	0,08	0,08	≤0,02	1,07

Le tableau C montre que l'addition de vitamine K dans le milieu de culture est très importante pour l'activité du facteur IX produit. On peut noter que l'importance de ce supplément de vitamine est d'autant plus important que le temps d'infection est long.

L'ensemble de ces résultats montre l'importance du supplément de vitamine K dans les milieux de culture des cellules infectées.



Fractionnement du facteur IX produit par les
cellules infectées par le virus vaccine
sauvage (WT) ou recombinant (CII)

Les différentes lignées de cellules animales ont été infectées par le virus recombinant ou sauvage à une multiplicité de 1 pfu/cellule. Après 24 heures, les milieux de culture sont récoltés puis fractionnés sur citrate de barium. Le facteur IX est ensuite dosé dans les deux fractions au moyen d'un test ELISA, seule la fraction adsorbée sur barium est dosée avec un test d'activité (mesure de la restauration de la coagulation d'un plasma d'hémophile).

Résultats exprimés en unité de facteur IX :

TABLEAU D

Lignées	Virus	Quantité de facteur IX avant fractionnement (ELISA)	Quantité de facteur IX après fractionnement		
			Fraction non adsorbée sur barium (ELISA)	Fraction adsorbée sur barium (ELISA) (ACTIVITE)	Fraction adsorbée sur barium (ACTIVITE)
Namalwa	CII WT	14,5 0,5	0,42 0,06	0,41 0,03	0,50 0,30
143B	CII WT	3,5 0,5	0,48 0,08	0,92 0,04	0,40 0,08
MRC5	CII WT	4,0 0,5	0,70 0,07	0,34 0,04	0,48 0,36
MDCK	CII WT	7,0 0,5	0,98 0,08	0,88 0,04	0,24 0,04
LM-TK ⁻	CII WT	- 0,4	0,18 0,01	0,66 0,01	0,18 0,02
CEF*	CII WT	12 0,5	2,94 0,07	1,96 0,04	4,16 1,92

* cellules embryonnaires de poulets

0162782



5 Ces résultats montrent que toutes les cellules testées sont capables d'opérer la γ -carboxylation du facteur IX ; cependant, l'efficacité de cette modification post-traductionnelle varie suivant les lignées. Ces résultats démontrent que les cellules en cultures testées peuvent être utilisées pour produire des protéines γ -carboxylées et possédant une activité biologique : le facteur IX récupéré dans les milieux de culture est au moins partiellement actif.

10 Cellules primaires de rein de singe

Les cellules de rein de singe récemment trypsiné ont été placées en culture. Cette culture primaire une fois confluente a été infectée dans les conditions décrites ci-dessus.

15 Après 24 heures d'infection, les milieux de culture ont été collectés et fractionnés sur bariun.

Les résultats sont les suivants (pour 40 ml de milieu):

TABEAU E

	<u>Facteur IX dans le milieu brut (U antigène)</u>	<u>Facteur IX dans la fraction non adsorbée (U antigène)</u>	<u>Facteur IX dans la fraction adsorbée (U antigène)</u>	<u>Facteur IX dans la fraction adsorbée (U activité)</u>
Virus WT	< 0,4	< 0,08	< 0,02	0,24
Virus CII	12,4	1,8	1,9	2,0

Ces résultats montrent que les cellules primaires de rein de singe peuvent être utilisées pour la production de facteur IX actif.

Expression du facteur IX en utilisant
le virus Cowpox

Le vecteur est construit en utilisant le schéma expérimental (figure 7) déjà décrit pour l'isolement de VVRTG2. Quelques modifications du protocole expérimental sont toutefois nécessaires.

Les cellules CHO-K1 (ATCC CCL61) ont été utilisées à la place des cellules embryonnaires de poulets. Pour l'infection, le virus du Cowpox, souche Brighton, a été employé. Les milieux de culture utilisés sont ceux préconisés pour les cellules CHO : le MBE a été substitué par le milieu Alpha 2000 et le sérum SVN a été remplacé par le sérum de veau foetal (SVF).

La construction est identique jusqu'à la construction de pTG393.

On effectue ensuite un cotransfert entre pTG393, l'ADN du virus de la vaccine sauvage dans les cellules CHO infectées avec le virus Cowpox, comme décrit précédemment. Il convient de remarquer que si dans la construction de VVRTG2 la recombinaison entre l'ADN du plasmide, l'ADN de la vaccine cotransféré et le génome viral n'est pas établie ou comprise, le protocole utilisé pour le recombinant Cowpox requiert la recombinaison des 3 entités.

Le virus obtenu après recombinaison est non ts et peut infecter les cellules CHO.

Le procédé utilisé pour l'expérience de recombinaison permet d'enrichir la production de virus



en virus recombinants entre le génome du virus Cowpox (thermosensible sur les cellules CHO) et l'ADN du virus de la vaccine (non thermosensible) et, éventuellement, le vecteur du facteur IX, pTG393.

5 Les virus produits sont ensuite clonés et sélectionnés pour leur caractère TK⁻ comme indiqué précédemment.

10 On a ensuite vérifié que le cADN du facteur IX est bien intégré dans le génome viral. Un clone sélectionné a été utilisé pour l'étude de l'expression du facteur IX dans les cellules CHO.

15 Pour cela, les cellules CHO-K1 sont infectées à 1 pfu par cellule et l'infection accomplie dans le milieu Alpha 2000 supplémenté en SVF et vitamine K. Le milieu de culture est fractionné sur citrate de baryum.

Un résultat typique est le suivant :

Pour 30 ml de culture, on obtient 6,4 U d'antigène :

. dans la fraction non absorbée, on récolte

0,3 U d'antigène,

20 . dans la fraction absorbée, 0,86 U d'antigène

et 0,64 U d'activité coagulante.

Le facteur IX produit dans les cellules CHO est actif.

25 Dans la fraction absorbée sur baryum, il existe une différence de 20 % entre l'activité mesurée et l'activité attendue compte tenu de la quantité d'antigène. Cette différence peut être significative, mais d'autres tests plus précis devraient être accomplis pour déterminer si le facteur IX produit par les cellules CHO est
30 complètement actif. On peut cependant affirmer que le

facteur IX produit dans les cellules CHO possède une activité voisine de celle de la molécule humaine naturelle.

5 La souche suivante a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'INSTITUT PASTEUR, 28 rue du Docteur-Roux, PARIS 15ème le 30 avril 1985:
. E. coli, comportant le plasmide pTG393, sous le n° 1-446.

Analyse des milieux de culture de cellule hépatique Hep62 infectés par le virus de la vaccine de type sauvage ou recombinant avec pT6393.

		Virus de type sauvage			Virus recombinant		
		Temps d'infection			Temps d'infection		
		4h	8h	22h	4h	8h	22h
Fraction non adsorbée au citrate de Barium	Quantité antigène (g/ml)	0,36	0,33	0,95	4,2	5,57	1,84
	Activité coagulante (g/ml)	2,3	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8
Fraction adsorbée sur le citrate de barium	Quantité antigène (g/ml)	0,29	0,41	0,559	1,0	4,2	89,3
	Activité coagulante (g/ml)	1,2	1,2	0,9	3,3	5,8	71,2

BIBLIOGRAPHIE

BERTINA R.M. et VELTKAMP J.J. (1981) In Hemostasis and Thrombosis, Bloom A.L. et Thomas D.T. Eds. pp. 98-110, Churchill Livingstone, London.

HEDNER U. et DAVIE E.W. (1982), in Hemostasis and Thrombosis, Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J. et Salzman E.W. Eds. pp. 29-38, J.B. Lippincott Co., Philadelphia.

TOLSTOSHEV P., BERG R.A., RENNARD S.I., BRADLEY K.N.
TRAPNEL B.C. et CRYSTAL R.G. (1981). J. Biol. Chem. 256, 3135-3140.

DENG G. et WU R. (1981). Nucl. Acids Res. 9, 4173-4188.

MURRAY N.E., BRAMMAR W.J. et MURRAY K. (1977), Mol. Gen. Genetics 150, 53-61.

MacGILLIVRAY R.T.A., DEGEN S.H.F., CHANDRA T., WOO S.L.C.
ET DAVIE E.W. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5153-5157.

CHUNG D.W., RIXON M.W., MacGILLIVRAY R.T.A. et DAVIE E.W.
(1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1466-1470.

KOHLI V., BALLAND A., WINTZERITH M., SAUERWALD R., STAUB A.
et LECOCQ J.P. (1982). Nucl. Acids Res. 10, 7439-7448.

FRITZ H.J., BELAGAJE R., BROWN E.L., FRITZ R.H., JONES R.A.,
LEES R.F. et KHORANA H.G. (1978). Biochemistry 17, 1257-1267.

GRUNSTEIN M. et WALLIS J. (1979). Methods in Enzymology 68, 379-389.

KATAYAMA K., ERICSSON L.H., ENFIELD D.L., WALSH K.A.,
NEURATH H., DAVIE E.W. et TITANI K. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4990-4991.

DI SCIPIO R.G., HERMODSON M.A., YATES S.G. et DAVIE E.W.
(1977). Biochemistry 16, 698-706.

MESSING J. et VIEIRA J. (1982). Gene 19, 269-276.

SANGER F., NICKLEN S. et COULSON A.R. (1977); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.

MAXAM A.M. et GILBERT W. (1980). Methods in Enzymology 65, 499-555.



0

0

6

0

DI SCIPIO R.G., KURACHI K. et DAVIE E.W. (1978). J. Clin. Inves. 61, 1528-1538.

COOPER D.W. (1978) in The Biochemical Genetics of Man, Brock D.J.H. et Mayo O., pp. 271-324, Eds. Academic Press London.

MIZUOCHI T., TANIGUCHI T., FUJIKAWA K., TITANI K. et KOBATA A. (1983). J. Biol. Chem. 258, 6020-6024.

DRILLIEN R. et SPEHNER D. (1983) Virology 131, 385-393.

KIENY M.P., LATHE R. et LECOCQ J.P. (1983) Gene 26, 91-99.

LATHE R., KIENY M.P., SKORY S. et LECOCQ J.P. (1984), DNA, in press.

LUSKY M., BOTCHAN M. (1981). Nature 293, 79-81.

MACKETT M., SMITH J.L. & MOSS B. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419.

PANICALI D. & PAOLETTI E. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931.

PANICALI D., DAVIS S.W., WEINBERG R.L. & PAOLETTI E. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5364-5368.

SMITH G.L., MACKETT M. et MOSS B. (1983). Nature 302, 490-495.

VENKATESAN S., BAROUDY B.M. & MOSS B. (1981). Cell 125, 805-813.

VIEIRA J. & MESSING J. (1982). Gene 18, 259-268.

WEIR J.P. & MOSS B. (1983). J. Virol. 46, 530-537.

DRILLIEN R., SPEHNER D. & KIRN A. (1982). Virology 119 372-381.

DRILLIEN R., KOEHREN F. & KIRN A. (1981). Virology 111 488-499.

KURACHI K., DAVIE E.W. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79, 6461-6464.

MILETRICH J.P., BROZE G.J., MAJERUS P.W. (1981). Methods in Enzymology 80, 221-228 (Academic Press Inc.).



JAYE M., de la SALLE H., SCHAMBER F., BALLAND A., KOHLI V.,
FINDELI A., TOLSTOSHEV P., LECOCQ J.P. (1983) Nucl. Acids
Res., 11, 2325-2335.

SOUTHERN E.M. (1975). J. Mol. Biol., 94, 51-69.

0

0

6

0

REVENDECATIONS

- 1) Vecteur d'expression dans les cellules de vertébré du facteur IX ou d'une protéine analogue, caractérisé en ce qu'il est constitué du génome d'un virus de la famille des Poxvirus dans lequel a été
5 inséré un gène codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue du facteur IX.
- 2) Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le Poxvirus est du genre Orthopoxvirus.
- 3) Vecteur selon la revendication 2, caractérisé
10 en ce que l'Orthopoxvirus est choisi parmi la vaccine et le virus Cowpox.
- 4) Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le gène est sous le contrôle d'un promoteur de Poxvirus.
- 15 5) Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit gène est sous la promotion d'un promoteur de la vaccine.
- 6) Vecteur selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit promoteur de la vaccine est le promoteur
20 du gène de la protéine 7,5K.
- 7) Vecteur selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que ledit gène est cloné dans le gène TK de la vaccine.
- 8) Cellule de vertébré infectée par un vecteur
25 selon l'une des revendications 1 à 7.
- 9) Cellule selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellule choisie parmi les lignées Vero, BHK et CHO et des sous-clones de ces lignées.
- 10) Procédé de préparation du facteur IX ou d'une
30 protéine analogue, caractérisé en ce qu'on cultive des cellules selon l'une des revendications 8 et 9 et que l'on récupère le facteur IX ou la protéine analogue formés.

5 11) Procédé de préparation de protéine fabriquée par le foie, caractérisé en ce que l'on cultive une lignée de cellules hépatiques infectées par un virus de la vaccine dans le génome duquel a été inséré le gène codant pour ladite protéine sous la promotion d'un promoteur de la vaccine.

10 12) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la culture cellulaire infectée est cultivée sur un milieu comportant de la vitamine K.

13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la quantité de vitamine K ajoutée est telle qu'elle assure la saturation du milieu de culture.

15 14) Facteur IX ou protéine analogue obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 10 à 13.

35 40 45 50
a. thr glu lys thr thr glu phe trp lys gln tyr val asp gly asp gln cys glu ser

b. ACX GAGAAG ACX ACXGAG^A TT^C TTGG AAGCAG^A TA^C GTXGATGGXGAT^C CAG^A TGT^C GAG^A TCX^{AGC}

c. TGAGAAGACT ACAGAG TTC TGG AAGCAG TAT GTG GAT GGT GAT CAG TGT GAG
+++ + ++ ++ ++ ++++++ +++ ++ +++ +++ +++ +++

d. TGAA AGAACA ACTGAA TTT TGG AAG CAG TAT GTT GAT GGAGAT CAGTGT GAG
244 250 260 270 280 290

1/7

0162782

FIG.1

1 ATG CAG CCG GIG AAC ATC ATC 25
 met gln arg val asn met ile met ala glu ser pro gly leu ile thr ile lys leu leu gly tyr leu leu ser
 56
 75
 100
 125
 150
 175
 200
 225
 250
 275
 300
 325
 350
 375
 400
 425
 450
 475
 500
 525
 550
 575
 600
 625
 650
 675
 700
 725
 750
 775
 800
 825
 850
 875
 900
 925
 950
 975
 1000
 1025
 1050
 1075
 1100
 1125
 1150
 1175
 1200
 1225
 1250
 1275
 1300
 1325
 1350
 1375
 1400
 1425
 1450
 1475
 1500
 1525
 1550
 1575
 1600
 1625
 1650
 1675
 1700
 1725
 1750
 1775
 1800
 1825
 1850
 1875
 1900
 1925
 1950
 1975
 2000
 2025
 2050
 2075
 2100
 2125
 2150
 2175
 2200
 2225
 2250
 2275
 2300
 2325
 2350
 2375
 2400
 2425
 2450
 2475
 2500
 2525
 2550
 2575
 2600
 2625
 2650
 2675
 2700
 2725
 2750
 2775
 2800
 2825
 2850
 2875
 2900
 2925
 2950
 2975
 3000
 3025
 3050
 3075
 3100
 3125
 3150
 3175
 3200
 3225
 3250
 3275
 3300
 3325
 3350
 3375
 3400
 3425
 3450
 3475
 3500
 3525
 3550
 3575
 3600
 3625
 3650
 3675
 3700
 3725
 3750
 3775
 3800
 3825
 3850
 3875
 3900
 3925
 3950
 3975
 4000
 4025
 4050
 4075
 4100
 4125
 4150
 4175
 4200
 4225
 4250
 4275
 4300
 4325
 4350
 4375
 4400
 4425
 4450
 4475
 4500
 4525
 4550
 4575
 4600
 4625
 4650
 4675
 4700
 4725
 4750
 4775
 4800
 4825
 4850
 4875
 4900
 4925
 4950
 4975
 5000
 5025
 5050
 5075
 5100
 5125
 5150
 5175
 5200
 5225
 5250
 5275
 5300
 5325
 5350
 5375
 5400
 5425
 5450
 5475
 5500
 5525
 5550
 5575
 5600
 5625
 5650
 5675
 5700
 5725
 5750
 5775
 5800
 5825
 5850
 5875
 5900
 5925
 5950
 5975
 6000
 6025
 6050
 6075
 6100
 6125
 6150
 6175
 6200
 6225
 6250
 6275
 6300
 6325
 6350
 6375
 6400
 6425
 6450
 6475
 6500
 6525
 6550
 6575
 6600
 6625
 6650
 6675
 6700
 6725
 6750
 6775
 6800
 6825
 6850
 6875
 6900
 6925
 6950
 6975
 7000
 7025
 7050
 7075
 7100
 7125
 7150
 7175
 7200
 7225
 7250
 7275
 7300
 7325
 7350
 7375
 7400
 7425
 7450
 7475
 7500
 7525
 7550
 7575
 7600
 7625
 7650
 7675
 7700
 7725
 7750
 7775
 7800
 7825
 7850
 7875
 7900
 7925
 7950
 7975
 8000
 8025
 8050
 8075
 8100
 8125
 8150
 8175
 8200
 8225
 8250
 8275
 8300
 8325
 8350
 8375
 8400
 8425
 8450
 8475
 8500
 8525
 8550
 8575
 8600
 8625
 8650
 8675
 8700
 8725
 8750
 8775
 8800
 8825
 8850
 8875
 8900
 8925
 8950
 8975
 9000
 9025
 9050
 9075
 9100
 9125
 9150
 9175
 9200
 9225
 9250
 9275
 9300
 9325
 9350
 9375
 9400
 9425
 9450
 9475
 9500
 9525
 9550
 9575
 9600
 9625
 9650
 9675
 9700
 9725
 9750
 9775
 9800
 9825
 9850
 9875
 9900
 9925
 9950
 9975
 10000
 10025
 10050
 10075
 10100
 10125
 10150
 10175
 10200
 10225
 10250
 10275
 10300
 10325
 10350
 10375
 10400
 10425
 10450
 10475
 10500
 10525
 10550
 10575
 10600
 10625
 10650
 10675
 10700
 10725
 10750
 10775
 10800
 10825
 10850
 10875
 10900
 10925
 10950
 10975
 11000
 11025
 11050
 11075
 11100
 11125
 11150
 11175
 11200
 11225
 11250
 11275
 11300
 11325
 11350
 11375
 11400
 11425
 11450
 11475
 11500
 11525
 11550
 11575
 11600
 11625
 11650
 11675
 11700
 11725
 11750
 11775
 11800
 11825
 11850
 11875
 11900
 11925
 11950
 11975
 12000
 12025
 12050
 12075
 12100
 12125
 12150
 12175
 12200
 12225
 12250
 12275
 12300
 12325
 12350
 12375
 12400
 12425
 12450
 12475
 12500
 12525
 12550
 12575
 12600
 12625
 12650
 12675
 12700
 12725
 12750
 12775
 12800
 12825
 12850
 12875
 12900
 12925
 12950
 12975
 13000
 13025
 13050
 13075
 13100
 13125
 13150
 13175
 13200
 13225
 13250
 13275
 13300
 13325
 13350
 13375
 13400
 13425
 13450
 13475
 13500
 13525
 13550
 13575
 13600
 13625
 13650
 13675
 13700
 13725
 13750
 13775
 13800
 13825
 13850
 13875
 13900
 13925
 13950
 13975
 14000
 14025
 14050
 14075
 14100
 14125
 14150
 14175
 14200
 14225
 14250
 14275
 14300
 14325
 14350
 14375
 14400
 14425
 14450
 14475
 14500
 14525
 14550
 14575
 14600
 14625
 14650
 14675
 14700
 14725
 14750
 14775
 14800
 14825
 14850
 14875
 14900
 14925
 14950
 14975
 15000
 15025
 15050
 15075
 15100
 15125
 15150
 15175
 15200
 15225
 15250
 15275
 15300
 15325
 15350
 15375
 15400
 15425
 15450
 15475
 15500
 15525
 15550
 15575
 15600
 15625
 15650
 15675
 15700
 15725
 15750
 15775
 15800
 15825
 15850
 15875
 15900
 15925
 15950
 15975
 16000
 16025
 16050
 16075
 16100
 16125
 16150
 16175
 16200
 16225
 16250
 16275
 16300
 16325
 16350
 16375
 16400
 16425
 16450
 16475
 16500
 16525
 16550
 16575
 16600
 16625
 16650
 16675
 16700
 16725
 16750
 16775
 16800
 16825
 16850
 16875
 16900
 16925
 16950
 16975
 17000
 17025
 17050
 17075
 17100
 17125
 17150
 17175
 17200
 17225
 17250
 17275
 17300
 17325
 17350
 17375
 17400
 17425
 17450
 17475
 17500
 17525
 17550
 17575
 17600
 17625
 17650
 17675
 17700
 17725
 17750
 17775
 17800
 17825
 17850
 17875
 17900
 17925
 17950
 17975
 18000
 18025
 18050
 18075
 18100
 18125
 18150
 18175
 18200
 18225
 18250
 18275
 18300
 18325
 18350
 18375
 18400
 18425
 18450
 18475
 18500
 18525
 18550
 18575
 18600
 18625
 18650
 18675
 18700
 18725
 18750
 18775
 18800
 18825
 18850
 18875
 18900
 18925
 18950
 18975
 19000
 19025
 19050
 19075
 19100
 19125
 19150
 19175
 19200
 19225
 19250
 19275
 19300
 19325
 19350
 19375
 19400
 19425
 19450
 19475
 19500
 19525
 19550
 19575
 19600
 19625
 19650
 19675
 19700
 19725
 19750
 19775
 19800
 19825
 19850
 19875
 19900
 19925
 19950
 19975
 20000
 20025
 20050
 20075
 20100
 20125
 20150
 20175
 20200
 20225
 20250
 20275
 20300
 20325
 20350
 20375
 20400
 20425
 20450
 20475
 20500
 20525
 20550
 20575
 20600
 20625
 20650
 20675
 20700
 20725
 20750
 20775
 20800
 20825
 20850
 20875
 20900
 20925
 20950
 20975
 21000
 21025
 21050
 21075
 21100
 21125
 21150
 21175
 21200
 21225
 21250
 21275
 21300
 21325
 21350
 21375
 21400
 21425
 21450
 21475
 21500
 21525
 21550
 21575
 21600
 21625
 21650
 21675
 21700
 21725
 21750
 21775
 21800
 21825
 21850
 21875
 21900
 21925
 21950
 21975
 22000
 22025
 22050
 22075
 22100
 22125
 22150
 22175
 22200
 22225
 22250
 22275
 22300
 22325
 22350
 22375
 22400
 22425
 22450
 22475
 22500
 22525
 22550
 22575
 22600
 22625
 22650
 22675
 22700
 22725
 22750
 22775
 22800
 22825
 22850
 22875
 22900
 22925
 22950
 22975
 23000
 23025
 23050
 23075
 23100
 23125
 23150
 23175
 23200
 23225
 23250
 23275
 23300
 23325
 23350
 23375
 23400
 23425
 23450
 23475
 23500
 23525
 23550
 23575
 23600
 23625
 23650
 23675
 23700
 23725
 23750
 23775
 23800
 23825
 23850
 23875
 23900
 23925
 23950
 23975
 24000
 24025
 24050
 24075
 24100
 24125
 24150
 24175
 24200
 24225
 24250
 24275
 24300
 24325
 24350
 24375
 24400
 24425
 24450
 24475
 24500
 24525
 24550
 24575
 24600
 24625
 24650
 24675
 24700
 24725
 24750
 24775
 24800
 24825
 24850
 24875
 24900
 24925
 24950
 24975
 25000
 25025
 25050
 25075
 25100
 25125
 25150
 25175
 25200
 25225
 25250
 25275
 25300
 25325
 25350
 25375
 25400
 25425
 25450
 25475
 25500
 25525
 25550
 25575
 25600
 25625
 25650
 25675
 25700
 25725
 25750
 25775
 25800
 25825
 25850
 25875
 25900
 25925
 25950
 25975
 26000
 26025
 26050
 26075
 26100
 26125
 26150
 26175
 26200
 26225
 26250
 26275
 26300
 26325
 26350
 26375
 26400
 26425
 26450
 26475
 26500
 26525
 26550
 26575
 26600
 26625
 26650
 26675
 26700
 26725
 26750
 26775
 26800
 26825
 26850
 26875
 26900
 26925
 26950
 26975
 27000
 27025
 27050
 27075
 27100
 27125
 27150
 27175
 27200
 27225
 27250
 27275
 27300
 27325
 27350
 27375
 27400
 27425
 27450
 27475
 27500
 27525
 27550
 27575
 27600
 27625
 27650
 27675
 27700
 27725
 27750
 27775
 27800
 27825
 27850
 27875
 27900
 27925
 27950
 27975
 28000
 28025
 28050
 28075
 28100
 28125
 28150
 28175
 28200
 28225
 28250
 28275
 28300
 28325
 28350
 28375
 28400
 28425
 28450
 28475
 28500
 28525
 28550
 28575
 28600
 28625
 28650
 28675
 28700
 28725
 28750
 28775
 28800
 28825
 28850
 28875
 28900
 28925
 28950
 28975
 29000
 29025
 29050
 29075
 29100
 29125
 29150
 29175
 29200
 29225
 29250
 29275
 29300
 29325
 29350
 29375
 29400
 29425
 29450
 29475
 29500
 29525
 29550
 29575
 29600
 29625
 29650
 29675
 29700
 29725
 29750
 29775
 29800
 29825
 29850
 29875
 29900
 29925
 29950
 29975
 30000
 30025
 30050
 30075
 30100
 30125
 30150
 30175
 30200
 30225
 30250
 30275
 30300
 30325
 30350
 30375
 30400
 30425
 30450
 30475
 30500
 30525
 30550
 30575
 30600
 30625
 30650
 30675
 30700
 30725
 30750
 30775
 30800
 30825
 30850
 30875
 30900
 30925
 30950
 30975
 31000
 31025
 31050
 31075
 31100
 31125
 31150
 31175
 31200
 31225
 31250
 31275
 31300
 31325
 31350
 31375
 31400
 31425
 31450
 31475
 31500
 31525
 31550
 31575
 31600
 31625
 31650
 31675

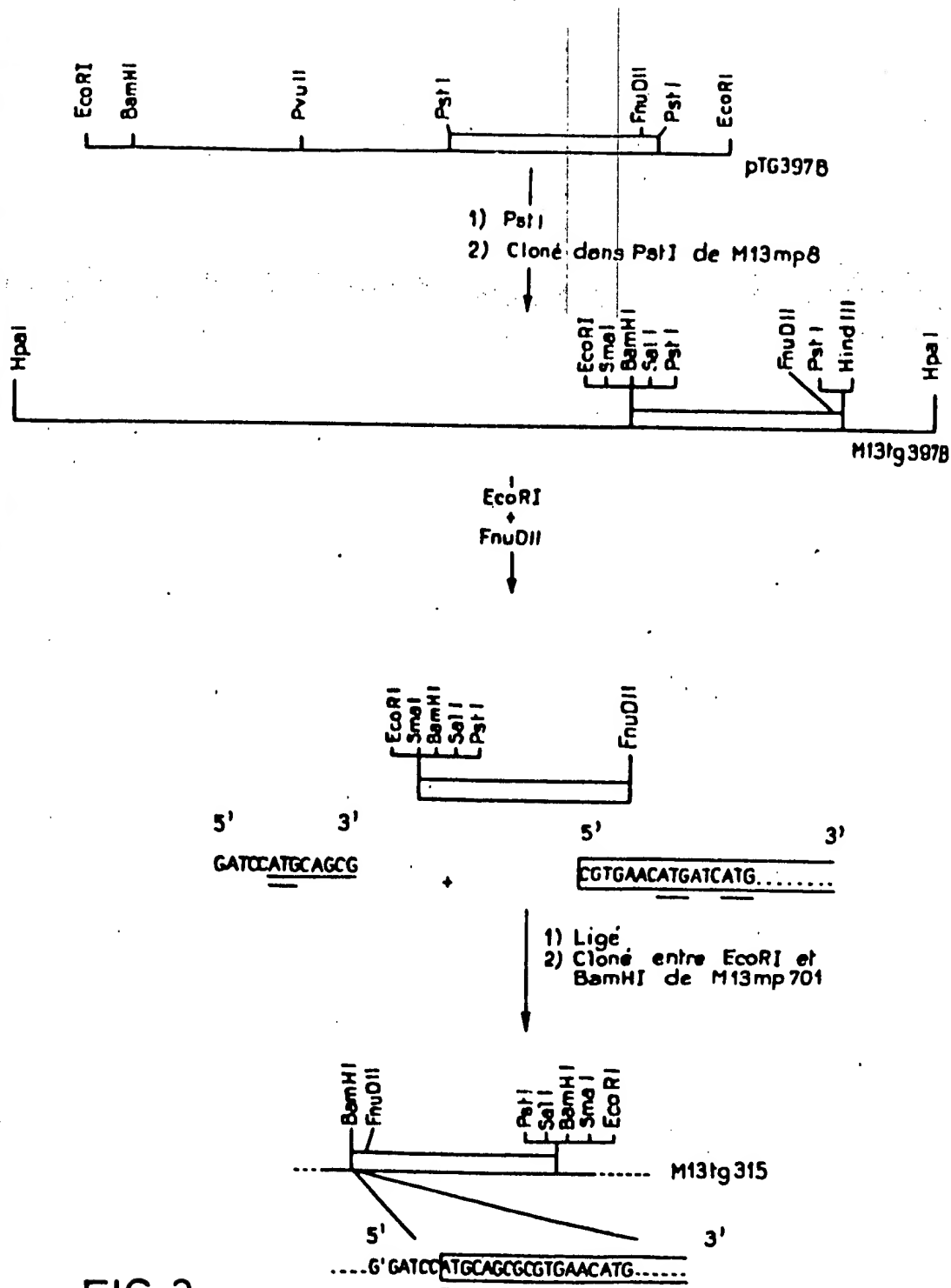


FIG.3

0162782

4/7

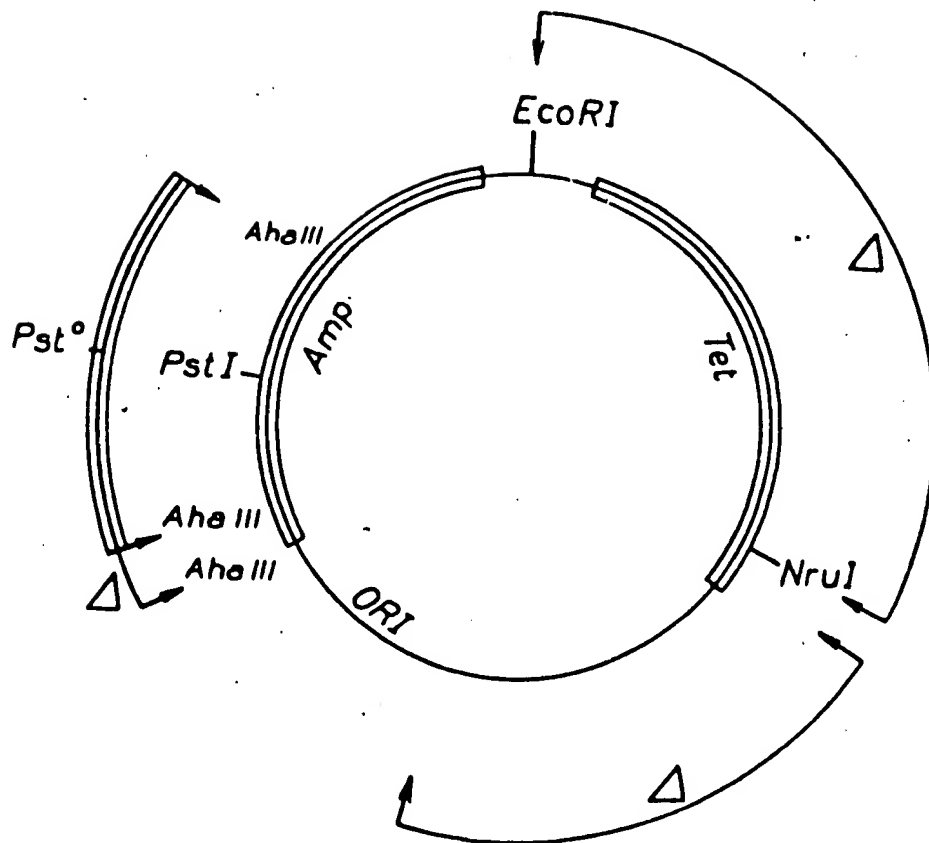


FIG. 4

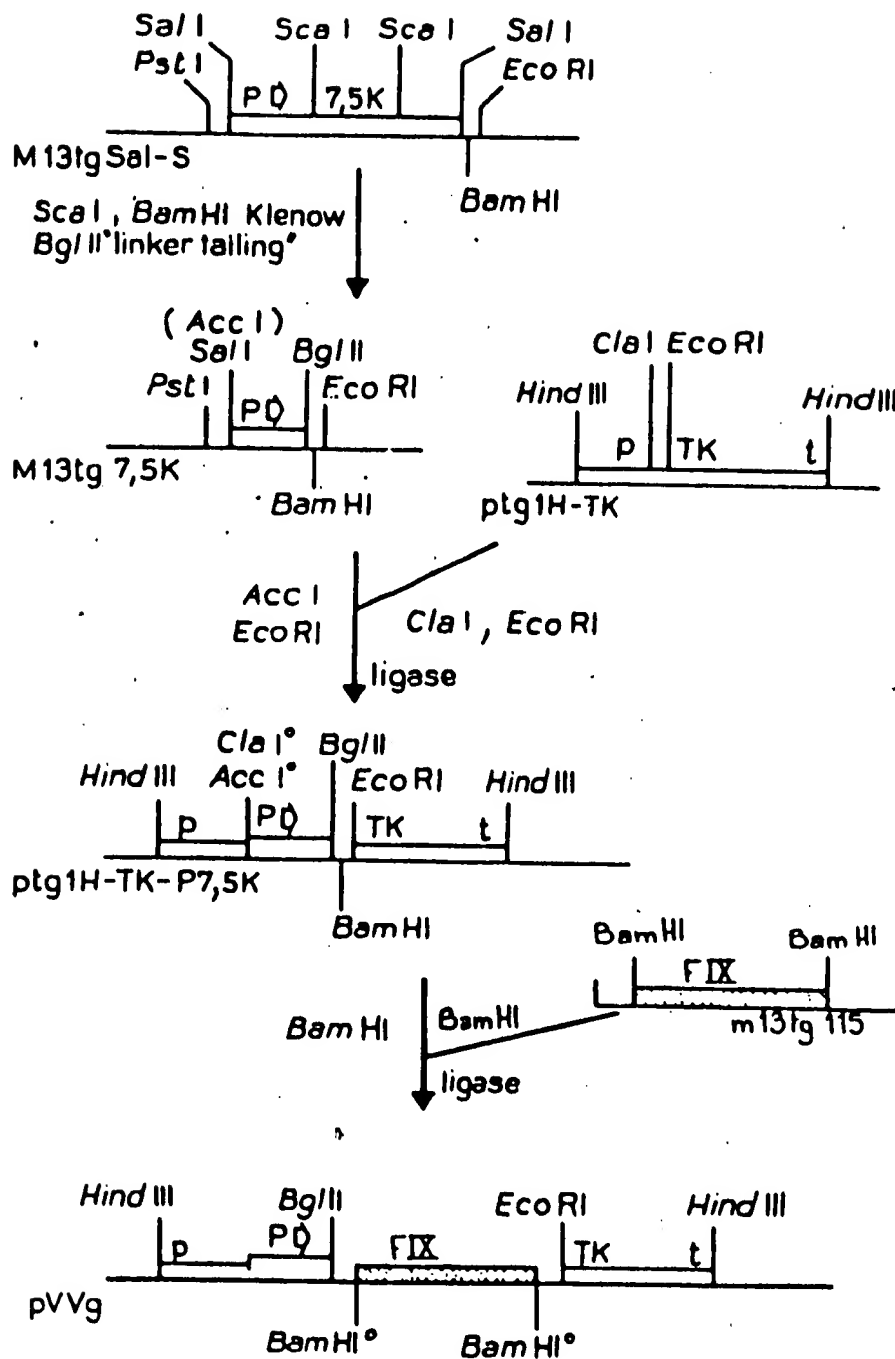


FIG.5

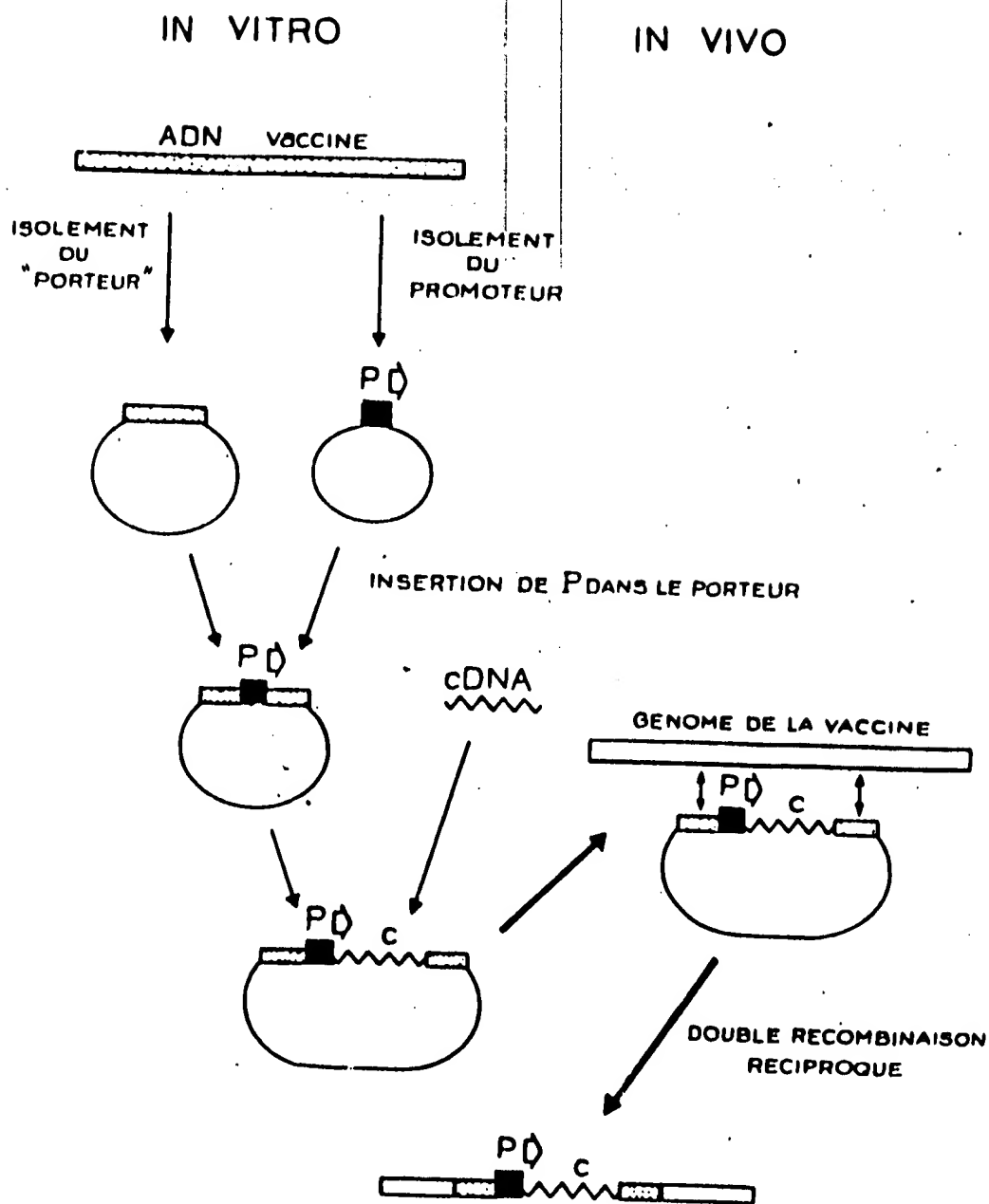


FIG.6

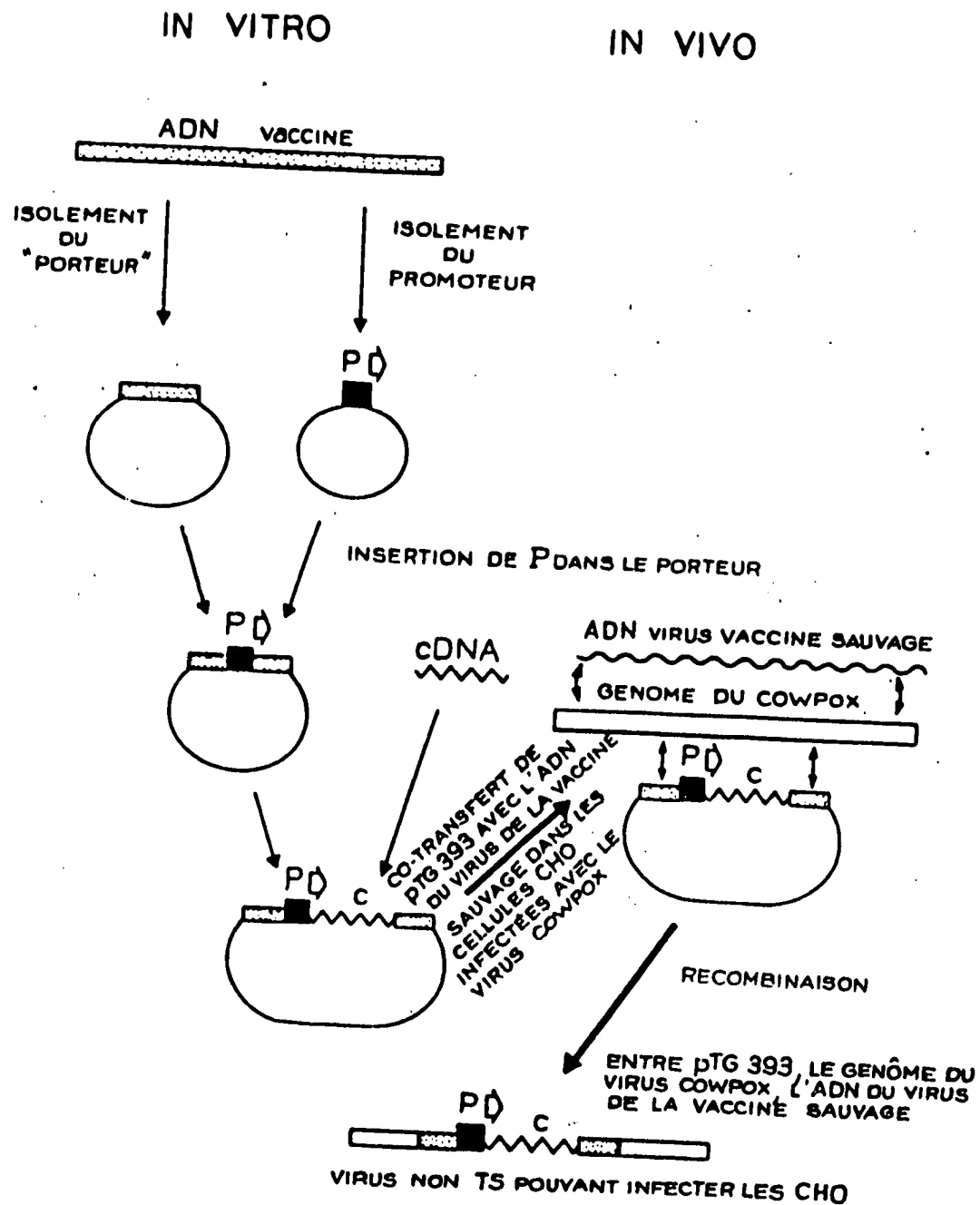


FIG. 7



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0162782

Numéro de la demande

EP 85 40 0999

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (int. Cl. 4)
D, Y	NUCLEID ACIDS RESEARCH, vol. 11, no. 8, avril 1983, pages 2325-2335, IRL Press Ltd., Oxford, GB; M. JAYE et al.: "Isolation of a human anti-haemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic oligonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX" * En entier *	1-14	C 12 N 15/00 C 12 N 5/00 C 12 N 9/50
D, Y	--- NATURE, vol. 302, no. 5908, avril 1983, pages 490-495, Macmillan Journals Ltd., Chesham, Bucks., GB; G.L. SMITH et al.: "Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen" * En entier *	1-14	
Y	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 80, no. 23, décembre 1983, pages 7155-7159, Washington, US; G.L. SMITH et al.: "Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters" * En entier *	1-14	C 12 N A 61 K
--- -/-			
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 09-07-1985	Examineur DESCAMPS J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille document correspondant	



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0162782

Numero de la demande

EP 85 40 0999

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (int. Cl. 4)
Y	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 49, no. 3, mars 1984, pages 857-864, American Society for Microbiology,; M. MACKETT et al.: "General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes" * En entier *	1-14	
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 19, 7 novembre 1983, page 179, no. 65367p, Columbus, Ohio, US; & US - A - 445 892 (UNITED STATES DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 13-05-1983 * Résumé *	1-14	
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 9, 29 août 1983, page 167, no. 153207s, Columbus, Ohio, US; & US - A - 445 451 (UNITED STATES DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 13-05-1983 * Résumé *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (int. Cl. 4)
---		---	
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 09-07-1985	Examinateur DESCAMPS J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille document correspondant	
X	particulièrement pertinent à lui seul		
Y	particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		
A	arrière-plan technologique		
O	divulgaration non-écrite		
P	document intercalaire		

0985-103 03 02



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0162782

Numéro de la demande

EP 85 40 0999

Page 3

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (int. Cl. 4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 5, 2 février 1970, page 175, no. 20284k, Columbus, Ohio, US; G.S. RANHOTRA et al.: "Vitamin K and the synthesis of factors VII-X by isolated rat liver cells" & PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1969, 132(2), 509-13 * Résumé *	12, 13	
A	EP-A-0 083 286 (HEALTH RES. INC.)		
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 86, no. 7, 14 février 1977, page 314, no. 40873u, Columbus, Ohio, US; H. SUOMELA: "Human coagulation factor IX. Isolation and characterization" & EUR. J. BIOCHEM. 1976, 71(1), 145-54 * Résumé *	14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (int. Cl. 4)
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 09-07-1985	Examineur DESCAMPS J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	